

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Problem Image Mailbox.**

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following patent application as filed with the office.

Filing Date: 8 February 2003

Application Number: 03115319.4

Application Type: Invention-Creation

Title: A THERMOSENSITIVE AND BIODEGRADABLE MICROGEL
AND A METHOD FOR THE PREPARATION THEREOF

Applicant: FUDAN UNIVERSITY

Inventors: DING Jiandong, ZHU Wen, WANG Biaobing

Commissioner: WANG Jingchuang

State Intellectual Property Office of P.R. China

2 December, 2003

State of New York

County of New York

}

ss

This is to certify that the attached is a true copy of the original.

Date:

January 20, 2004

Maria C.H. Lin
Maria C.H. Lin

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2003 02 08

申 请 号： 03 1 15319.4

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 一种温敏性可降解微凝胶及其制备方法

申 请 人： 复旦大学

发明人或设计人： 丁建东； 朱文； 王标兵



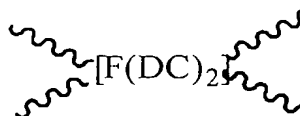
中华人民共和国
国家知识产权局局长


王景川

2003 年 12 月 2 日

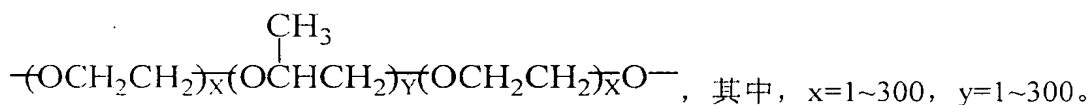
权利要求书

1、一种温敏性可降解微凝胶，其特征在于为由反向温敏性大分子或寡聚物与可降解基团组成的聚合物化学交联网络，其化学结构式简写为：



式中，表示任意形式的化学交联，F(DC)₂表示交联点之间的嵌段共聚物链段，其中 F 代表温敏性大分子或寡聚物，D 为可降解部分，C 为聚合交联部分。

2、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于温敏性大分子或寡聚物 F 为聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的任意形式的嵌段共聚物，尤其是以下的对称三嵌段结构：



3、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于可降解部分 $D = (R_1)_m (R_2)_n (R_3)_l$ ，而 R_1 、 R_2 、 R_3 为可降解单元，其结构式分别表示为 $R_1 = \text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-CH}_2\text{-O-}$ ， $R_2 = \text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-CH(CH}_3\text{)-O-}$ ， $R_3 = \text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-(CH}_2\text{)}_5\text{-O-}$ ，其中， $m = 0\sim 100$ ， $n = 0\sim 100$ ， $l = 0\sim 100$ ，且 m 、 n 和 l 不同时为零。

4、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于聚合交联部分 C

$$= \text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-}\overset{\text{I}}{\underset{\text{R}}{\text{C}}}\text{-CH}_2\text{-}$$

，其中，R 为 H 或 CH₃ 或其它烷基。

5、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于温敏性大分子或寡聚物 F 为主体，重量含量为 51%~99.9%，可降解部分 D 在该化学交联凝胶中的重量含量为 49%~0.1%。

6、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于化学交联网络为由满足权利要求 2-4 所述条件的不同种嵌段共聚物链段混合交联而成。

7、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于化学交联网络中含有部分悬键，其在化学交联网络中的重量含量为 0~49%。

8、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于粒径为 5nm~5mm。

9、根据权利要求 1 所述的温敏性可降解微凝胶，其特征在于微粒处于本体聚合物状态或与溶剂混合的状态。

10、一种如权利要求 1-9 所述的温敏性可降解微凝胶的制备方法，采用大单体技术直接聚合交联而形成凝胶，采用反相悬浮技术形成微粒，其特征在于采用具有生物相容性的温敏性大分子或寡聚物 F 为大单体中心部分，通过开环聚合方法与脂肪族交酯或多元内酯共聚得共聚物；然后在此共聚物分子主链两端接上可化学交联的双键反应基团，得到大分子单体；由大分子单体溶液制备可降解温敏性凝胶微粒。

11、根据权利要求 10 所述的制备方法，所采用的大分子单体为两端接上双键反应基团的可交联型大单体；或混有部分只有单个端基被接上双键反应基团的大单体，其所占重量百分比为 0~49%。

12、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于所采用的大分子单体为符合权利要求 1 中所述 $F(DC)_2$ 通式的不同大单体的混合物。

13、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于组成大分子单体中心部分的 F 为聚氧化乙烯和聚氧化丙烯组成的任意形式的嵌段共聚物。

14、根据权利要求 11 所述的制备方法，其特征在于所组成大分子单体中成分之一的 R_1 或 R_2 或 R_3 ，或其共聚物为寡聚 DL-丙交酯或聚 DL-丙交酯、寡聚 L-丙交酯或聚 L-丙交酯、寡聚乙交酯或聚乙交酯、寡聚 ϵ -己内酯或聚 ϵ -己内酯、寡聚 ϵ -烷基取代己内酯或聚 ϵ -烷基取代己内酯中的任何一种，以及由上述各类寡聚物或高聚物组成的任何顺序和其它形式的共聚物。


15、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于构成大分子单体成分之一的可化学交联部分 C 为丙烯酸酯、甲基等烷基取代的丙烯酸酯或其它丙烯酸酯类的衍生物。

16、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于所制备的大分子单体的共聚物单元中，中心单元 F 与脂肪族交酯或多元内酯的投料摩尔比为 0.1~99.9: 99.9~0.1。

17、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于上述共聚反应采用的催化剂为异辛酸亚锡，其用量为 F 的羟基基团摩尔数的 0.01%以上；反应温度为 80~280℃；反应时间为 3~50 小时。

18、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于上述共聚反应采用的催化剂为氯化钙或锌粉，其用量与 F 的羟基基团摩尔比为 0.2: 0.8~0.8: 0.2；反应温度为 50~250℃；反应时间为 3~50 小时。

19、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于双键的用量为与 F 的羟基基团的摩尔比为 1: 1~100:1 之间；或者双键的用量与 F 和 D 的共聚物的羟基基团的摩尔比为 1:



00:1 之间。

20、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于反相悬浮聚合中的大单体溶液重量用量为 1%~49%。

21、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于大分子单体溶液重量浓度为 3~98%，其溶剂以水、水溶液或亲水性溶剂、亲水性溶液为主体介质。

22、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于在大分子单体溶液中加入有水溶性氧化还原引发剂过硫酸盐，其用量占大分子单体重量的 0.01~8%。

23、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于反相悬浮聚合中的连续相为不溶于水的有机溶剂，包括正庚烷、正辛烷、环己烷、甲苯、二甲苯等以及它们的混合溶剂；而分散相则为疏油的溶剂，一般为水或水溶液。

24、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于反相悬浮聚合中加入有乳化剂：W/O 非离子型 Span 和 Tween 系列，两者重量比为 100~50：0~50；乳化剂重量用量为 1%~40%。

25、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于反相悬浮聚合的反应温度为 30~100℃；反应时间为 0.5~5 小时；搅拌速度为 60 转/分钟~2000 转/分钟。

说明书

一种温敏性可降解微凝胶及其制备方法

技术领域

本发明属高分子材料和药剂辅料技术领域，具体涉及一种具有降解特性的温敏性水凝胶微粒及其制备方法。

背景技术

凝胶制成微粒以后在一些场合比大块凝胶更便于使用。例如，近二三十年来微粒技术在药剂学领域就得到飞速发展。目前已有 30 多类药物已经采用了微粒化技术，其中包括解热镇痛药、抗生素、多肽、维生素、以及抗癌药等。由于许多药物本身在体内很不稳定，对于如蛋白质、酶、激素、肽类等敏感性生物分子而言，微粒技术不失为一种良好的药物控释方法，近年来得到越来越多的关注。

微粒所采用的材料一般分为三大类：天然高分子材料，如明胶、海藻酸盐、壳聚糖等；半合成高分子材料，如羧甲基纤维素盐、醋酸纤维素酞酸酯、甲基纤维素、乙基纤维素等；合成高分子材料，如聚酰胺、聚丙烯酸树脂、聚乙烯醇和聚碳酸酯、聚氨基酸、聚乳酸(PLA)、丙交酯乙交酯共聚物(PLGA)、聚乳酸聚乙二醇共聚物(PLA-PEG)等。其中有非生物降解性材料，也有生物降解性材料，或在一定的条件下(如改变 pH)可以溶解的材料。由于对微包裹所采用的材料具有一定的要求，如适宜的释药速度、一定的稳定性、无毒、不影响药物的药理作用、一定的强度和可塑性以及亲水性、渗透性、和溶解性等，所以目前以生物降解性类材料研究较多，其中，聚酯类等合成高分子的应用十分广泛。

在药剂学研究领域，近二十年来，基因工程方法产生了许多活性蛋白质(如重组骨形成蛋白、表皮生长因子、神经生长因子、胰岛素、干扰素等)，但这类活性蛋白质类药物很不稳定，易于变性，常用的给药方式大部分不适合于蛋白质药物。

在人体器官修复重建的组织工程中也需要各类细胞生长因子(其中大多数为球蛋白)的介入，才能使得细胞正常生长形成新的组织(Lanza et al 2000)。细胞生长因子采用局部注射方法，因此并不需要具有靶向性。然而，一次性注射球蛋白水溶液容易导致其流失和快速失活分解，多次注射显然不方便。目前有两种方法导入缓慢释放的生长因子：一是在所加入的一部分细胞中导入相关基因，二是把生长因子作为药物，采用药物控制释放系统。前者存在基因安全性隐患。我们的发明是用作局部控制释放载体，将载体制成微粒，可使生长因子或药物均匀分散。

目前,许多研究工作采用疏水性的可降解材料来包埋蛋白质类药物。Singh M.等(Singh et al 2001)用 PLGA 微粒用作囊材包埋胰岛素类生长因子 rhIGF-I,并用作在体外和体内控释。Rajeev A.J.等(Rajeev et al 2000)研究了牛心脏细胞色素 C 以及骨骼肌红蛋白模型药物从可注射的 PLGA 微粒中的释放行为。为改善上述微粒的疏水性,许多研究者采用聚乳酸聚乙二醇共聚物(PLA-PEG)作为微囊囊材(如:Cho et al 2001),运用水/油/水的复乳法制备了 PLLA-PEG 共聚物微粒,并包埋了牛血清白蛋白(BSA)等模型药物。

聚合物水凝胶也已被用作蛋白质类药物的载体。Kim S.W.课题组(Jeong et al 1997)采用了可注射性水凝胶,此给药方式虽然不涉及任何有机溶剂,但采用了大块凝胶,并且在包裹药物过程中温度必须高于人体体温。Amarpreet S.S.等(Amarpreet et al 1993)采用紫外光引发形成可降解的聚乙二醇水凝胶并包裹牛血清蛋白,研究了牛血清白蛋白的体外释放行为,但此方法对紫外光敏感的蛋白并不适用;此外,仅大块凝胶被尝试作为药物缓释载体。Rajeev A.J.等(Rajeev et al 2000)报导采用 PLGA 共聚物微球作为注射型药物控释载体,但此类微粒由疏水材料组成,而且无法避免采用有机溶剂。交联的明胶、胶原作为凝胶可以包裹吸附带有相反电荷的多肽,海藻酸盐可包裹蛋白质,但此两类凝胶降解的速率不易大范围内调控。

需要指出的是,单单是可降解的药物缓释载体材料(Cohen et al 1991; Langer 1998; Bawa et al 1985; Li et al 2002; 傅杰等 1997, 1998)和单单是智能型的高分子材料(Wu and Zhou 1995, 1996; Wu and Jiang 1997; Zhuo and Li 2003)已有较多报道。但是,能够将两种特性结合在同一个材料当中的报道则十分少见(Amarpreet et al 1993; Jeong et al 1997)。RealGel 是一种嵌段共聚物类的温敏性可降解凝胶(Zentner et al 2001),它是一种物理凝胶,而不是化学凝胶;此外,该凝胶高温下为液体,低温(体温)下呈凝胶状态而将药物包裹,这种正向的温度敏感性容易导致蛋白质在凝胶化之前的高温状态就已经变性失活或至少是部分失活。由 Hubbell 等人(Hubbell 2000)报导的可降解化学凝胶虽然具有反向温敏性,但是只有大块凝胶被报道,并且所采用的紫外引发方法难以应用到反相悬浮技术之中。

参考文献

- 1、Amarpreet S.S., Chandrashekhar P.P., Hubbell J.A. (1993) Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(α -hydroxy acid)diacrylatemacromers, *Macromolecules*, 26:581-587
- 2、Bawa R., Siegel R., Marasca B., Karel M., Langer R. (1985) An explanation for the sustained release of macromolecules from polymers, *J. Controlled Release* 1:259-267
- 3、Cho K.Y., Choi S.H., Kim S.H., Nam C.H., Park T.G., Park J.K. (2001) Protein release

9
microparticles based on the blend of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) and oligo-ethylene glycol grafted poly(l-lactide), *J. Control. Release*, 76:275-284

4、Cohen S., Yoshioka T., Lucarelli M., Hwang L.H., Langer R. (1991) Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres, *Pharm. Res.*, 8:713-720

5、丁建东、朱文、张俊川 (2002) 一种可降解的化学交联水凝胶及其制备方法, 中国发明专利, 公开号: CN1332189A

6、傅杰, 卓仁禧, 范昌烈 (1998) 聚酯酸酐的合成及其药物释放性能研究, 高等学校化学学报, 19(5):813-816

7、傅杰, 卓仁禧, 范昌烈 (1997) 主链含磷酸酯的聚酸酐药物控制释放材料研究, 高等学校化学学报, 18(10):1706-1710

8、Hubbell J.A. (2000) Injectable hydrogel composites, US Patent 6,129,761

9、Jeong B., Bae Y.H., Lee D.S., Kim S.W. (1997) Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature*, 388:860-862

10、Langer R. (1998) Drug delivery and targeting, *Nature*, 392(suppl.):5-10

11、Lanza R. P., Langer R., Vacanti J. (2000) *Principles of Tissue Engineering* (2nd Ed.), Academic Press, New York

12、Li M.X., Zhuo R.X., Qu F.Q. (2002) Synthesis and characterization of novel biodegradable poly(ester amide) with ether linkage in the backbone chain, *J. Polym. Sci. part A: Polym. Chem.* 40(24):4550-4555

13、Rajeev A.J., Christopher T. R., Aruna M.R., Malick A.W., Navnit H.S. (2000) Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50:257-262

14、Singh M., Shirley B., Bajwa K., Samara E., Hora M., O'Hagan D. (2001) Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles, *J. Control. Release*, 70:21-28

15、Wu C., Zhou S.Q. (1995) Thermodynamically stable globule state of a single poly(N-isopropylacrylamide) chain in water, *Macromolecules*, 28(15):5388-5390

16、Wu C., Zhou S.Q. (1996) Internal motions of both poly(N-isopropylacrylamide) linear chains and spherical microgel particles in water, *Macromolecules*, 29(5):1574-1578

17、Wu C., Jiang S.H. (1997) Polymer gel composition and uses therefore, US Patent 6,030,634

18、Zentner G.M., Rathi R., Shin C., McRea J.M., Seo Min-Hyo, Oh H., Rhee B.G.

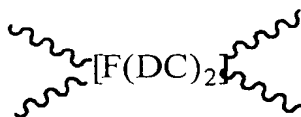
Mestecky J. Moldoveanu Z. Morgan M. and Weitman S. (2001) Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, J. Control. Release, 72:203-215



19、Zhuo R.X., Li W. (2003) Preparation and characterization of macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels for the controlled release of proteins, J. Polym. Sci. part A: Polym. Chem. 41(1):152-159

发明内容

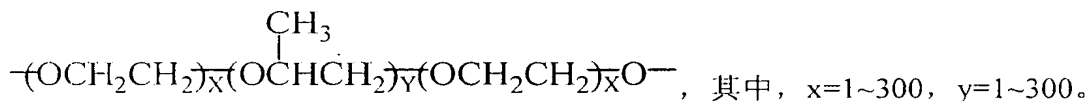
本发明的目的在于提出一种温敏性可降解微凝胶及其制备方法。该微凝胶降解速率可控，可用于蛋白质等药物的包埋和控释。

本发明提出的温敏性可降解微凝胶，是由反向温敏性大分子或寡聚物与可降解基团组成的聚合物化学交联网络，其降解速率不依赖于所形成凝胶的条件，独立可控。粒径大小随温度变化而改变，一般为 5nm-5mm，较好的为 1 μ m-200 μ m。其化学结构式简写为：

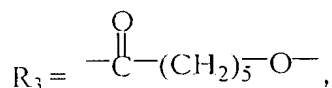
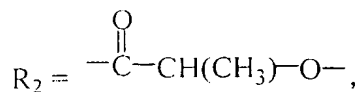
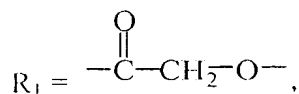


式中，  表示任意形式的化学交联，F(DC)₂ 表示交联点之间的链段，其中 F 代表温敏性大分子或寡聚物，D 为可降解部分，C 为聚合交联部分。

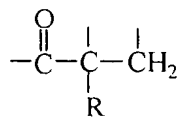
上述温敏性可降解微粒凝胶中，其 F 可以为聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的任意形式的嵌段共聚物，尤其是对称三嵌段共聚物，其分子式可表示为：



上述微凝胶中，可降解部分 D = (R₁)_m (R₂)_n (R₃)_l，而 R₁、R₂、R₃ 为可降解单元，其分子式可表示为



其中，m = 0~100，n = 0~100，l = 0~100，且 m、n 和 l 不同时为零。



上述微凝胶中，聚合交联部分 C = $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{R} \end{array}$ ，其中，R 为 H 或 CH₃ 或其它烷基。

上述微凝胶网络可以由满足上述条件的不同种嵌段共聚物链段混合交联而成。

上述微凝胶中化学交联网络中还可以含有 0~49% 的悬键，即，链段只有一端连接在无穷大网络之中。

本发明的可降解温敏性微凝胶，采用温敏性大分子或寡聚物 F 为主体，占 51%~99.9%（重量百分含量），可降解的单元或寡聚物 R₁ 或 R₂ 或 R₃，或其共聚物在该化学交联凝胶中重量含量为 49%~0.1%（重量百分含量）。

上述微凝胶可以处于本体聚合状态，也可以处于与溶剂混合状态。当微粒呈水凝胶状态时，其溶剂可以包括纯水、缓冲液、体液、细胞培养液、组织培养液，以及其它水溶液和不以有机溶剂为主体的溶剂介质。

本发明还提出的上述的温敏性可降解微凝胶的制备方法。采用大分子单体技术直接聚合交联形成凝胶，采用反相悬浮技术形成微粒。所谓大分子单体也称为大单体，指可以进行聚合的单体的分子量较大、本身就是聚合物或至少为寡聚物。本发明的大分子单体用具有良好生物相容性的温敏性类大分子或寡聚物 F 作为大单体中心部分，通过开环聚合方法与脂肪族聚酯或多元内酯共聚得共聚物；然后在此共聚物分子主链两端接上可化学交联的双键反应基团，得大分子单体；通过反相悬浮聚合技术，由大分子单体(水)溶液制备可降解(水)凝胶微粒。

任何化学交联网络中难免有一些悬键，即，分子链只有一端连接在交联网络上。本发明所采用的大单体中可以混有 0~49% 重量百分比的单个双键端基的大单体。由于这些单端基大单体的存在以及双端基大单体的转化率未必达到 100%，所合成的化学凝胶中可能、也允许含有悬键。

在制备微凝胶时，还可以采用满足上述 F(DC)₂ 型的不同种大单体的混合溶液来实施交联。

上述方法中，作为大分子单体中心部分的温敏性类大分子或寡聚物 F 一般采用端基为羟基的聚氧化乙烯（PEO）和聚氧化丙烯（PPO）组成的嵌段共聚物。可降解部分 D 的脂肪族聚酯 R₁ 或 R₂ 或 R₃，或其共聚物等为寡聚 DL-丙交酯或聚 DL-丙交酯、寡聚 L-丙交酯或聚 L-丙交酯、寡聚乙交酯或聚乙交酯、寡聚ε-己内酯或聚ε-己内酯、寡聚ε-烷基取代己内酯或聚ε-烷基取代己内酯中的任何一种，以及上述各类寡聚物和高聚物组成的任何顺序和其它形式的共聚物。可化学交联部分 C 为丙烯酸酯、甲基等烷基取代的丙烯酸酯或其它

丙烯酸酯类的衍生物。共聚合单元投料摩尔比为 F: 脂肪族交酯或多元内酯为 0.1~99.9: 99.9~0.1。

上述方法中, F 与脂肪族交酯或多元内酯开环共聚的条件为: 在 0.1mmHg 真空和催化剂作用下, 反应温度为 80~280℃, 一般为 120~180℃, 反应时间为 1 小时以上, 一般为 3~50 小时; 最佳反应温度为 140~160℃, 反应时间为 15 小时以上, 一般为 15~24 小时。催化剂一般采用异辛酸亚锡, 用量为 F 的羟基基团摩尔数的 0.01% 以上, 一般为 0.1%~5%, 较佳用量为 0.5%~1.5%。催化剂也可采用氯化钙或锌粉, 其用量与 F 的羟基基团摩尔比为 0.2: 0.8 到 0.8: 0.2 之间, 较佳用量为与 F 的羟基基团摩尔比为 0.4: 0.6 到 0.6: 0.4 之间, 反应温度为 50~250℃, 一般为 120~160℃, 反应时间为 1 小时以上, 一般为 3~50 小时。

上述方法中, 用二氯甲烷等溶剂将上述产物溶解, 在 -10~4℃ 用过量的无水乙醚沉淀、并去除未反应的温敏性类大分子或寡聚物 F、可降解的单元或寡聚物 R₁(或 R₂ 或 R₃ 或其共聚物) 以及残留的催化剂, 真空干燥、保存。将上述产物溶解在二氯甲烷等溶剂中, 然后与丙烯酰氯或甲基丙烯酰氯或其它丙烯酰氯衍生物反应, 以便在共聚物分子主链两端接上可化学交联的双键反应基团, 其用量与 F 的羟基基团摩尔比为 1:1 到 100:1 之间, 一般为 2:1 到 20:1 之间; 或者双键的用量与 F 和 D 的共聚物的羟基基团摩尔比为 1:1 到 100:1 之间, 一般为 2:1 到 20:1 之间。在共聚物二氯甲烷或氯仿溶液中加入与丙烯酰氯或其衍生物等摩尔的三乙胺, 在搅拌和干燥氮气流保护下, 滴加入丙烯酰氯或甲基丙烯酰氯或其它丙烯酰氯衍生物, 在冰浴中 (0~5℃) 反应 4~12 小时, 然后在室温 (20℃ 左右) 下反应 10~12 小时, 反应完毕后过滤、沉淀 (-10~0℃ 无水乙醚作沉淀剂), 收集沉淀, 真空干燥, 得到大分子单体。

上述方法中, 反相悬浮聚合时, 大单体溶液的重量用量为 1%-49%。大分子单体溶液重量浓度为 3~98%, 其溶剂以水、水溶液或亲水性溶剂、亲水性溶液为主体介质。在该大分子单体溶液中加入水溶性氧化还原引发剂, 该引发剂可以是过硫酸盐, 如过硫酸钾或过硫酸铵等, 用量占大分子单体重量的 0.001% 以上, 一般为 0.01~8%。有时, 也可以加入少量加速剂。

上述方法中, 反相悬浮聚合时的连续相为不溶于水的有机溶剂, 可以是正庚烷、正辛烷、环己烷、甲苯以及二甲苯等, 也可以是它们的混合溶剂; 而分散相则为疏油的溶剂, 一般为水或水溶液, 也可以是其它亲水性溶剂或亲水性溶液。

上述方法中, 反相悬浮聚合时在有机溶剂中加入有非离子 W/O 型乳化剂, 可以是 Span 和 Tween 系列, 也可以为它们的混合物, 两者重量用量比为 100~50: 0~50, 较佳比为 100~80: 0~20。

上述方法中，乳化剂重量用量为 1%~40%，较佳重量用量为 5%~15%；大单体溶液重量用量为 1%~49%，较佳重量用量为 7%~35%；反应温度为 30~100℃，一般为 45~80℃，搅拌速度为 60 转/分钟~2000 转/分钟；反应时间为 3 分钟以上，一般为 0.5~5 小时。反应完毕后过滤，用丙酮、水冲洗，冷冻干燥后得到干的凝胶微粒物质，并可以保存。所得粒子的粒径为 5nm~5mm。

本发明的“凝胶微粒”可以处于本体聚合物状态或与溶剂混合的状态。溶剂可以为水以及有机溶剂；一般采用水或水溶液作为溶胀微粒本体材料的物质，微粒呈水凝胶状态。这里的所谓“凝胶微粒”也包括处于其它溶剂当中的凝胶或无溶剂时单纯的微粒。当微粒呈水凝胶状态时，这里的“溶剂”可以包括纯水、缓冲液、体液、细胞培养液、组织培养液以及其它水溶液和不以有机溶剂为主体的溶剂介质。

本发明的凝胶微粒具有温度敏感性。低温下仅为化学凝胶，高温（体温）下同时为化学凝胶和物理凝胶。凝胶尺寸在相变温度以上时发生显著变化（一般为收缩）。对于具有反向温度敏感性的凝胶，可以在其相变温度以下将活性蛋白质吸收，在其相变温度以上凝胶网络有效孔径缩小，将吸收的活性蛋白包裹。如果蛋白质的尺寸介于凝胶舒张之后的孔径和收缩状态的孔径之间，则该蛋白质既在低温下进得去，又在体温下轻易出不来。凝胶是可降解的，降解速率还可以通过选择合适的聚酯或合适的共聚酯形式加以调节。被包裹的蛋白质可以通过凝胶的降解和蛋白质的扩散而被释放出来。冷冻干燥后，低温保存，蛋白质活性得以保持，操作也较为方便。同理有望包裹非蛋白质类的药物和其它物质。

本发明提出将水凝胶等制成微凝胶的形式，将药物、尤其是活性蛋白质大分子包埋，并在凝胶逐步降解过程中将其缓慢释放。将水凝胶等制成微凝胶，一般需在有机相中采用油包水的反相悬浮方法，但此时原位包埋蛋白质因接触有机溶剂和接触高温而容易导致其活性降低、甚至丧失。如先制备微凝胶、再加入蛋白质水溶液，则很难选择一个合适的凝胶网络孔径，使蛋白质既容易进去，又不易出来。为克服上述缺点，我们将化学凝胶和物理凝胶的原理结合起来，利用材料的智能性解决了上述“矛盾”。所谓化学凝胶指由化学键连接而成的无穷大网络，一般是不可回复的；而所谓物理凝胶指由于某些物理因素（如温度）变化所导致的凝胶化现象，往往是可逆的。

本发明采用温敏性聚合物作为可降解化学凝胶微粒的主体，可用于包埋蛋白质；模型药物的释放主要是通过凝胶自身的降解来控制。本发明不仅仅有望用于组织工程研究中的细胞生长因子的局部控释，而且在暂不要求靶向性的蛋白质类药物的控释方面有望具有较为广泛的适用性。

与其它药物缓释载体相比，本发明提出的可降解温敏性凝胶微粒具有如下特点：

- 1、本发明采用了微凝胶方式，且同时具有智能性和可降解性。
- 2、微凝胶完全由合成高分子材料构成，以生物相容性良好的嵌段共聚物作为主体。
- 3、本发明采用了反相悬浮技术和大单体制备技术相结合的方法制备微凝胶。
- 4、本发明的微凝胶具有温敏性，可以先制备微粒，后包裹药物，从而微粒在包埋蛋白质过程中，未接触到任何有机溶剂和高于体温的温度。
- 5、鉴于包裹药物发生在制备微凝胶之后，凝胶微粒中残余单体和引发剂可通过充分洗涤除去，容易保证凝胶微粒的生物相容性。
- 6、凝胶不带电荷，凝胶的降解主要为水解。
- 7、本发明的凝胶微粒大小可通过调节搅拌速度、乳化剂浓度来控制。
- 8、本发明的微凝胶实际为化学交联凝胶和物理交联凝胶特性的综合应用，相变温度可通过不同嵌段长度比例加以调节。
- 9、本发明的凝胶微粒网络的有效孔径可选用不同分子量的嵌段共聚物来控制。
- 10、本发明的凝胶微粒其降解速率可由选用不同的与温敏性聚合物共聚的聚酯及其它们之间的共聚比例来调控；凝胶微粒降解速率的调控基本不受凝胶化过程控制。
- 11、本材料不仅同时具有智能性和可降解性，而且上述多个基本参量（如降解速率、网孔尺寸等）可以基本独立调节，从而，该技术的通用性较强，参数加以调节即可以适用于不同分子的包裹和缓释。

具体实施方式

下面通过实施例进一步描述本发明，但不限于这些实施例。

实施例 1

反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$: L-丙交酯: 异辛酸亚锡 = 1: 8: 0.02，混合均匀后在 60℃ 抽真空 6 小时，以除去易挥发物，然后用惰性气体（氮气或氩气）置换数次，最后在真空（0.1mmHg）下热封安瓿管。在 140℃ 条件下共聚反应 24 小时。共聚产物的二氯甲烷溶液与丙烯酰氯（摩尔比为 1:10）反应，反应后过滤，滤液在无水乙醚（-10～0℃）中沉淀，收集沉淀，真空干燥，得大分子单体（ $\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$ ）-L8。以正庚烷为溶剂，加入 Span-60（占正庚烷重量 5%），升温至 60℃，然后滴加大单体（ $\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$ ）-L8 重量浓度为 20% 的水溶液，每秒 1~2 滴，最后使得该溶液在正庚烷中重量浓度为 8%，搅拌速度为 240 转/分钟，1 小时后停止搅拌；用筛网过滤，丙酮、去离子水冲洗后，冷冻干燥，得到粒径为 30μm-150μm 的凝胶微粒。该凝胶微粒在 37℃ 去离子水中达到溶胀平衡后，粒径为 50μm-200μm；温度降低到 4℃ 后，粒径大于 300μm。该凝胶微粒在体外 37℃、PBS 水溶液中降解两周，失重 48%。

实施例 2

反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{129}\text{-PPO}_{56}\text{-PEO}_{129}$: ϵ -己内酯: 异辛酸亚锡 = 1: 4: 0.02, 混合均匀后在 60°C 抽真空 6 小时, 以除去易挥发物, 然后用惰性气体 (氮气或氩气) 置换数次, 最后在真空 (0.1mmHg) 下热封安瓿管。在 150°C 条件下共聚反应 24 小时。共聚产物的二氯甲烷溶液与甲基丙烯酰氯 (摩尔比为 1:10) 反应, 反应后过滤, 滤液在无水乙醚 ($-10\sim 0^\circ\text{C}$) 中沉淀, 收集沉淀, 真空干燥, 得到大分子单体 ($\text{PEO}_{129}\text{-PPO}_{56}\text{-PEO}_{129}$)-CL4。以二甲苯为溶剂, 加入 Span-60 与 Tween-80 (两者重量比为 80: 20) 的混合乳化剂 (占二甲苯重量 10%), 升温至 80°C , 然后滴加大单体 ($\text{PEO}_{129}\text{-PPO}_{56}\text{-PEO}_{129}$)-CL4, 搅拌速度为 360 转/分钟, 0.5 小时后停止搅拌, 用筛网过滤, 丙酮、去离子水冲洗后, 冷冻干燥, 得到粒径为 $20\mu\text{m}\text{-}100\mu\text{m}$ 的凝胶微粒。

实施例 3

与实施例 1 操作相同, 反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$: ϵ -己内酯: L-丙交酯: CaH_2 = 1: 4: 4: 2, 得到大分子单体 ($\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$)-CL4-L4。以甲苯为溶剂, 加入 Span-60 与 Tween-80 (两者重量比为 90: 10) 的混合乳化剂 (占二甲苯重量 12%), 升温至 70°C , 然后滴加大单体 ($\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$)-CL4-L4 重量浓度为 25% 的水溶液, 每秒 1~2 滴, 最后使得该溶液在甲苯中重量浓度为 10%, 搅拌速度为 360 转/分钟, 0.5 小时后停止搅拌; 用筛网过滤, 丙酮、去离子水冲洗后, 冷冻干燥, 得到粒径为 $30\mu\text{m}\text{-}150\mu\text{m}$ 的凝胶微粒。

实施例 4

与实施例 1 操作相同, 反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{118}\text{-PPO}_{45}\text{-PEO}_{118}$: 乙交酯: 异辛酸亚锡 = 1: 6: 0.02, 得到大分子单体 ($\text{PEO}_{118}\text{-PPO}_{45}\text{-PEO}_{118}$)-G6。以环己烷为溶剂, 加入 Span-60 (占环己烷重量 15%), 升温至 60°C , 然后滴加大单体 ($\text{PEO}_{118}\text{-PPO}_{45}\text{-PEO}_{118}$)-G6 重量浓度为 35% 的水溶液, 每秒 1~2 滴, 最后使得该溶液在正庚烷中重量浓度为 8%, 搅拌速度为 240 转/分钟, 1 小时后停止搅拌; 用筛网过滤, 丙酮、去离子水冲洗后, 冷冻干燥, 得到粒径为 $20\mu\text{m}\text{-}150\mu\text{m}$ 的凝胶微粒。

实施例 5

以正庚烷为溶剂, 加入 Span-60 (占正庚烷重量 10%), 升温至 60°C , 然后滴加含有大单体 ($\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$)-L8 和大单体 $\text{PEO}_{129}\text{-PPO}_{56}\text{-PEO}_{129}$)-CL4 的水溶液, 其重量浓度分别为 10% 和 13%, 每秒 1~2 滴, 最后使得该溶液在正庚烷中重量浓度为 30%, 搅拌速度为 350 转/分钟, 1 小时后停止搅拌; 用筛网过滤, 丙酮、去离子水冲洗后, 冷冻干燥, 得到粒径为 $30\mu\text{m}\text{-}150\mu\text{m}$ 的凝胶微粒。

实施例 6

反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$: ϵ -己内酯: 异辛酸亚锡 = 1: 8: 0.02, 混合均匀后在 60℃ 抽真空 6 小时, 以除去易挥发物, 然后用惰性气体 (氮气或氩气) 置换数次, 最后在真空 (0.1mmHg) 下热封安瓿管。在 150℃ 条件下共聚反应 24 小时。共聚产物的二氯甲烷溶液与丙烯酰氯 (摩尔比为 1:15) 反应, 反应后过滤, 滤液在无水乙醚 (-10~0℃) 中沉淀, 收集沉淀, 真空干燥, 得大分子单体 ($\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$)-CL8。以正庚烷为溶剂, 加入 Span-80 (占正庚烷重量 30%), 升温至 60℃, 然后滴加大单体 ($\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$)-CL8 重量浓度为 20% 的水溶液, 每秒 1~2 滴, 最后使得该溶液在正庚烷中重量浓度为 8%, 搅拌速度为 1400 转/分钟, 1 小时后停止搅拌; 离心后, 丙酮、去离子水冲洗, 冷冻干燥, 得到粒径为 200nm-3 μm 的凝胶微粒。

实施例 7

反应物投料摩尔比为 $\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$: L-丙交酯: 异辛酸亚锡 = 1: 16: 0.02, 混合均匀后在 60℃ 抽真空 6 小时, 以除去易挥发物, 然后用惰性气体 (氮气或氩气) 置换数次, 最后在真空 (0.1mmHg) 下热封安瓿管。在 150℃ 条件下共聚反应 24 小时。共聚产物的二氯甲烷溶液与丙烯酰氯 (摩尔比为 1:10) 反应, 反应后过滤, 滤液在无水乙醚 (-10~0℃) 中沉淀, 收集沉淀, 真空干燥, 得大分子单体 ($\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$)-L16。以正庚烷为溶剂, 加入 Span 60 (占正庚烷重量 6%), 升温至 60℃, 然后滴加大单体 ($\text{PEO}_{103}\text{-PPO}_{39}\text{-PEO}_{103}$)-L16 重量浓度为 20% 的水溶液, 该水溶液中含有 10 μl 四甲基乙二胺的加速剂, 每秒 1~2 滴, 最后使得该溶液在正庚烷中重量浓度为 10%, 搅拌速度为 150 转/分钟, 1 小时后停止搅拌; 用筛网过滤, 丙酮、去离子水冲洗后, 冷冻干燥, 得到粒径为 0.5mm-2.5mm 的凝胶微粒。

实施例 8

在 4℃ 条件下, 将浓度为 20mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA) 蒸馏水溶液缓慢滴加在 200mg 由大单体 ($\text{PEO}_{100}\text{-PPO}_{65}\text{-PEO}_{100}$)-LA8 制备的凝胶微粒中, 直至凝胶微粒达到溶胀平衡, 需要上述牛血清蛋白溶液 2.8ml。然后将包裹蛋白的凝胶微粒加入 40ml PBS 溶液, 放置在 37℃ 恒温水浴中, 每隔一定时间取出 1ml 水溶液, 加入 1ml 新的 PBS 溶液, 以保持 100ml PBS 溶液体积不变, 测定取出溶液中 BSA 浓度。BSA 累积释放浓度逐步增加, 5 天后释放浓度趋于稳定, 累积释放量为 95.3%。

实施例 9

在 4℃ 条件下, 将浓度为 20mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA) 蒸馏水溶液缓慢滴加在 180mg 由大单体 ($\text{PEO}_{129}\text{-PPO}_{56}\text{-PEO}_{129}$)-CL4 制备的凝胶微粒中, 直至凝胶微粒达到溶胀平衡,

需要上述牛血清蛋白溶液 2.5ml。然后将包裹蛋白的凝胶微粒加入 40mlPBS 溶液，放置在 37℃ 恒温水浴中，每隔一定时间取出 1ml 水溶液，加入 1ml 新的 PBS 溶液，以保持 100mlPBS 溶液体积不变，测定取出溶液中 BSA 浓度。BSA 累积释放浓度逐步增加，10 天后释放浓度趋于稳定，累积释放量为 97.5%。

实施例 10

在 4℃ 条件下，将 100mg 由大单体 (PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀)-CL8 制备的凝胶微粒加入浓度为 25mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA) 蒸馏水溶液中，溶胀 48hr，直至凝胶微粒达到溶胀平衡。过滤，冷冻干燥，然后将包裹蛋白的干燥凝胶微粒加入 40mlPBS 溶液，放置在 37℃ 恒温水浴中，每隔一定时间取 1ml 水溶液，加入 1ml 新的 PBS 溶液，以保持 40mlPBS 溶液体积不变，测定取出溶液中 BSA 浓度。BSA 累积释放浓度逐步增加，8 天后释放浓度趋于稳定，累积释放量为 94.7%。

实施例 11

在 4℃ 条件下，将 150mg 由大单体 (PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀)-LA16 制备的凝胶微粒加入浓度为 30mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA) 蒸馏水溶液中，溶胀 48hr，直至凝胶微粒达到溶胀平衡。过滤，冷冻干燥，然后将包裹蛋白的干燥凝胶微粒加入 40mlPBS 溶液，放置在 37℃ 恒温水浴中，每隔一定时间取 1ml 水溶液，加入 1ml 新的 PBS 溶液，以保持 40mlPBS 溶液体积不变，测定取出溶液中 BSA 浓度。BSA 累积释放浓度逐步增加，3 天后释放浓度趋于稳定，累积释放量为 96.8%。